



TITLE:

新規な光トリガーを用いた蛋白質の高次構造変化ダイナミクス検出法の開発と応用

AUTHOR(S):

寺嶋, 正秀

CITATION:

寺嶋, 正秀. 新規な光トリガーを用いた蛋白質の高次構造変化ダイナミクス検出法の開発と応用. 2006

ISSUE DATE:

2006-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/79569>

RIGHT:

p.24-145は学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

新規な光トリガーを用いた蛋白質の高次構造
変化ダイナミクス検出法の開発と応用

課題番号 12440164

平成 12－13 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2))
研究成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 寺嶋正秀

(京都大学大学院理学研究科 教授)

新規な光トリガーを用いた蛋白質の高次構造
変化ダイナミクス検出法の開発と応用

課題番号 12440164

平成 12－13 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2))
研究成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 寺嶋正秀

(京都大学大学院理学研究科 教授)

目次

はしがき	2
------	---

研究組織

研究経費

研究成果の概要

研究の目的および背景	3
------------	---

研究発表

学会誌、総説など	4
----------	---

口頭発表	7
------	---

成果	15
----	----

発表論文	23
------	----

はしがき

この報告書は、平成12年度～13年度の文部省科学研究助成金（基盤(B)(2)）による研究成果をまとめたものである。

蛋白質が機能を発現するとき、まず高次構造変化をおこし、蛋白-蛋白相互作用を変え、機能発現に至る。そのダイナミックスはどのような過程で起こるのであろうか。また、長年注目を浴びている問題として、蛋白質の折り畳み問題がある。多くの蛋白質は、変成した状態から活性を持つ状態に自発的に折れ畳むことができるが、変成した蛋白は、天文学的な数の構造の中からどうやってたった一つの正しい折り畳み構造を見つけるのであろうか。こうした問題に答えるため、ここではパルスレーザーを用いた非線形分光法を応用することで、高速構造変化からミリ秒のゆっくりとした変化まで、幅広い時間スケールで高次の構造変化を追跡する手法を開発し、実際の生体系に応用し、物理化学の視点からその構造変化について明らかにすることを目標とした。非線形分光法のうち過渡回折格子(TG)法、あるいは我々の開発した過渡レンズ(TL)法を用いて、生体系へ適用できるシステムを構築し、高次の構造変化やエネルギー変化を直接的に示す量を明確に取り出すための手法を確立することを試みた。幾つかの方法を試みるなど、試行錯誤を行ってきたが、まだまだ発展させなければならない点も多い。しかし、以下述べるように、ほぼ初期の目的に近いところまで達成できたと考えている。これらの研究成果は、多くの研究協力者や共同研究者との議論のもとで達成されたものであり、研究室の学生諸君や先生方にここに心より感謝いたします。

研究組織

研究代表者 寺嶋正秀（京都大学大学院理学研究科 教授）

研究経費

平成12年度	11500 千円
平成13年度	4700 千円
計	16200 千円

研究成果の概要

研究の目的および背景

タンパク質はアミノ酸が数 10～数 100 並んだ鎖からなり、それが一つの構造をとっている。その構造は温度や pH、変性剤などによって壊れ、構造の規則性を失う(変性)ののだが、もとの条件に戻すとタンパク質は再び同じ構造をとることも多い。この過程をタンパク質の折り畳みという。この折り畳んだ構造が、もしアミノ酸のランダムな配置により偶然に決まるのだとしたら、アミノ酸のとりうる配置は無限に数えられるため、Levinthal の言うように折り畳みが終了するのに無限に近い時間を要してしまうだろう。その折り畳みの道筋を明らかにすることは、なぜタンパク質が一つの構造をとるのかという疑問を解決する手がかりとなるかも知れない。このため、タンパク質折り畳み過程における中間体がどのようなエネルギー、構造を持つかを理解することは重要であり、大きな興味が持たれている。

中間体の構造を明らかにする一つの方法は、変成条件を緩やかにして中間体が多数を占める溶媒環境を作ることであろう。しかし、このような方法で中間体を得ることは難しい。すなわち、平衡状態では中間体は存在せず折り畳んだ構造(天然構造)と変性した構造(変性構造)の 2 状態があるのみであると言われている(2 状態モデル)ためである。多くの取りうる構造があるにもかかわらず 2 状態モデルで表されることは、タンパク質の折り畳みが協調的であることを示唆する。このように中間体は平衡状態においては存在しないため、折り畳みのダイナミクスをとらえることによって中間体の構造を知る必要があり、この中間体の構造についての実験、議論が多くなされている。

こうした問題を実験的に研究するためには、幾つかのアプローチが考えられるが、解決しなければならない多くの問題点がある。問題点を大きく分けると、如何に速く蛋白折り畳みのトリガーをかけるかと、如何に検出するかとの 2 点にあると考えられる。これまでに、ストップドフローや高速混合あるいはレーザー誘起温度ジャンプなどのトリガー法が開発され、過渡吸収やラマン散乱、CD 等で蛋白質ダイナミクスが検出されてきた。ここでは、新しい試みとして、パルスレーザーを用いた新しい光トリガー法を開発すると同時に、新しい視点からの検出法での研究を行う。幅広い時間スケールでエネルギーと高次の構造変化を追跡することで、生体分子の動的 landscape を描き、物理化学の視点からその構造やエネルギー変化と機能との関連について明らかにすることを目標とした。

検出法としては、過渡回折格子(TG)法、あるいは我々の開発した過渡レンズ(TL)法を、生体系へ適用できるシステムに構築し、蛋白質の高次の構造変化や蛋白質の会合過程、エネルギー変化を時間分解で検出する。検出する物理量として、エンタルピー変化、分子体積変化、拡散定数変化などを用いた。これらの量は、従来は定常状態にある蛋白の反応を調べるために用いられてきた長い歴史のある量であるが、刻々と変化しつつある反応に対しては測定手法が存在しなかったため、非平衡反応の中間体に対する測定例は全く無かった。例えば、蛋白質の構造変化においてエネルギー的な情報と全体の構造変化の情報は非常に重要であるが、驚くべきことに中間体のエネルギー位置さえ実験的に知られていない。そのため 20 年以上前に低温トラップ法を用いて測定されたデータが今だに多く引用され、それをもとに議論されている。凍結されている状態で測定されたエネルギーは、ほとんど何の意味も持たないと考えられるが、現在までの分光法ではそれにかわる手法を持たなかった。これに対して、TG 法をベースにした我々が最近開発した手法は、エンタルピー変化、分子体積変化、拡散定数変化の時間変化が追跡できると言う非常にユニークな特性を持つ。この手法により、

蛋白反応を研究することは、新しい分野になるであろう。

一方、蛋白質の折り畳み問題に挑戦するためには、非常に速い時間スケールで蛋白の環境を変化させる必要がある。トリガーをかける手法として pH ジャンプ法、光還元法、光異性化や光解離などの光反応を用いた。例えば、レーザーを用いて pH をナノ秒の時間スケールでジャンプする高速 pH ジャンプ法を開発し、変成から戻る際の蛋白質の折り畳み過程を検出することを目指した。また NADH を用いた光還元法を用いて、チトクロム C を 300 μ s 以内に折りたたみ条件にジャンプさせ、その後の変化を追跡した。同時に、ミオグロビンのリガンド解離反応に対しては、光解離反応を利用し、ロドプシンの構造変化を検出するためのトリガーとしては、生体でも使われているレチナールの光異性化反応を用いた。

装置の整備

本研究補助金によりレーザー励起顕微鏡や分光システムを導入した。また装置を組み立てるための光学部品や薬品類を購入し、計画に沿った実験を行うことが出来た。

研究発表

学会誌、総説など

M.Terazima, J.Cai, E.C.Lim

Time-resolved EPR and optical studies of intermoiety interactions in the lowest triplet state of L-shaped dimers of naphthalene: Conformation dependence of excitation exchange interaction
J.Phys.Chem.A, **104**,1662-1669(2000).

A.Ukai, N.Hirota, M.Terazima

Radical diffusion measured by the transient grating in a short time scale.
Chem.Phys.Lett., **319**,427-433(2000).

K.Takeshita, N.Hirota, M.Terazima

Enthalpy change and reaction volumes of photoisomerization reactions in solution: Azobenzene and p-coumaric acid
J.Photochem.Photobio.A, **134**,103-109(2000).

A.Ukai, N.Hirota, M.Terazima

Diffusion of organic molecules in the excited triplet states detected by the transient grating with a high wavenumber
J.Phys.Chem.A, **104**,6681-6688(2000).

K.Takeshita, N.Hirota, Y.Imamoto, M.Kataoka, F.Tokunaga, M.Terazima
Temperature dependent volume change of initial step of the photoreaction of Photoactive Yellow Protein studied by the transient grating
J.Am.Chem.Soc., **122**,8524-8528(2000).

N.Saga, Y.Kimura, N.Hirota, M.Terazima
Photothermalization processes of charge transfer complexes in liquids studied by the transient grating method
Chem.Phys.Lett., **332**,496-502(2000).

M.Terazima, Y.Nogami, T.Tominaga
Diffusion of a radical from an initiator of a free radical polymerization: a radical from AIBN
Chem.Phys.Lett., **332**,503-507(2000).

J.Choi, N.Hirota, M.Terazima
A pH jump reaction studied by the transient grating method: Photodissociation of o-nitro-benzaldehyde
J.Phys.Chem.A, **105**,12-18(2001).

M.Sakakura, S.Yamaguchi, N.Hirota, M.Terazima
Dynamics of structure and energy of horse carboxymyoglobin after photodissociation of the carbon monoxide
J.Am.Chem.Soc., **123**, 4286-4294(2001).

Y.Nishioku, M.Nakagawa, M.Tsuda, M.Terazima
A spectrally silent transformation in the photolysis of octopus rhodopsin: a protein conformational change without any accompanying change of the chromophore's absorption.
Biophys.J., **80**,2922-2927(2001).

K.Okamoto, N.Hirota, T.Tominaga, M.Terazima
Translational Diffusion of Ion Radicals Created by Electron Transfer in Charged Micellar Solutions probed by the Transient Grating Method and the Taylor Dispersion Method
J.Phys.Chem.A, **105**, 6586-6593(2001).

M.Sakakura, I.Morishima, M.Terazima
The structural dynamics and ligand releasing process after the photodissociation of sperm whale carboxymyoglobin
J.Phys.Chem.B, **105**,10424-10434(2001).

K.Okamoto, A.Kaneta, K.Inoue, Y.Kawakami, M.Terazima, G.Shinomiya, T.Mukai, Sg.Fujita
Carrier dynamics in InGaN/GaN SQW structure probed by the transient grating method with subpicosecond pulsed laser.
Phys.Stat.Sol., **228**,81 -84(2001).

R.Miyata, M.Terazima

Rate limitation of photothermal effect in solution

Anal.Sci., **17**, s231-s233(2001).

M.Sakakura, N.Hirota, K.Konishi, I.Morishima, M.Terazima

Study on photodissociation of carboxymyoglobin by the transient grating and photoacoustic methods

Anal.Sci., **17**, s317-s319(2001).

Y.Nishioku, N.Hirota, M.Nakagawa, M.Tsuda, M.Terazima

The energy and dynamics of photoreaction intermediates of octopus rhodopsin studied by the transient grating method

Anal.Sci., **17**, s323-s325(2001).

K.Takeshita, N.Hirota, Y.Imamoto, M.Kataoka, F.Tokunaga, M.Terazima

The structural change and energy dynamics in the photocycle of photoactive yellow protein

Anal.Sci., **17**, s320-s322(2001).

K.Okamoto, Y.Kawakami, S.Fujita, M.Terazima

Photothermal processes of wide-bandgap semiconductors probed by the transient grating method.

Anal.Sci., **17**, s312-s314(2001).

N.Saga, Y.Kimura, M.Terazima, N.Hirota

Energy dissipation process of photoexcited charge transfer complexes in fluids studied by the transient grating.

Anal.Sci., **17**, s234-s236(2001).

J.Choi, N.Hirota, M.Terazima

Energy and volume changes on the pH jump process studied by the transient grating technique

Anal.Sci., **17**, s13-s15(2001).

K.Okamoto, S.Sajiou, Y.Kawakami, S.Fujita, M.Terazima, G.Shimomiya, T.Mukai,

Direct observation of the nonradiative recombination processes in InGaN-based LEDs probed by the third-order nonlinear spectroscopy

Light-Emitting Diodes: Research, manufacturing, and Applications V,4278,150-157(2001).

K. Okamoto, T. Tojo, H. Tada, M. Terazima, K. Matsushige

Microscopic Patterning on the Polysilane Films by the Laser Induced Grating Technique.

Mol.Cryst.Liq.Cryst., in press.

K. Okamoto, Y. Kawakami, S. Fujita, M. Terazima, and S. Nakamura

Nonradiative Recombination Processes in GaN-based Semiconductors Probed by the Transient Grating Method.

Proc.Int.Workshop on Nitride Semiconductors IPAP Conf. Series 1.540-543(2001).

K.Okamoto, A.Kaneta, K.inoue, Y.Kawakami, M.Terazima, G.Shinomiya, T.Mukai, S.G.Fujita
Carrier dynamics in InGaN/GaN SQW structure probed by the transient grating method with subpicosecond pulsed laser.
Phys.Stat.Sol.,228,81-84(2001).

T. Ohmori, Y. Kimura, N. Hirota, and M. Terazima
Measurement of thermal diffusion and sound velocity of supercritical ethanol and methanol by the transient grating method”
Phys. Chem. Chem. Phys. 3, 3994-4000 (2001).

口頭発表

1. PYP の光反応サイクルにおける構造変化とエネルギーダイナミクス
竹下寛、寺嶋正秀、廣田襄、今元泰、片岡幹雄、徳永史生
日本化学会春季年会 2000 年 3 月 27-30 日 東京
2. 過渡回折格子法によるタコロドプシン光反応中間体のエネルギーとダイナミクス (2) 励起及びプローブ波長依存性
西奥義憲・寺嶋正秀・広田襄・中川将司・津田基之
日本化学会春季年会 2000 年 3 月 27-30 日 東京
3. 溶液中での短寿命中間体の並進拡散
鵜飼晃宏、廣田襄、寺嶋正秀
日本化学会春季年会 2000 年 3 月 27-30 日 東京
4. pH ジャンプを目的とした時間分解過渡回折格子法による o-nitrobenzaldehyde の光解離の研究
J.Choi、広田襄、寺嶋正秀
日本化学会春季年会 2000 年 3 月 27-30 日 東京
5. 過渡回折格子法による光還元過程の金イオンと金クラスターの拡散
原田雅史、岡本晃一、寺嶋正秀
日本化学会春季年会 2000 年 3 月 27-30 日 東京 1A241
6. 時間・空間分解レーザー分光法を用いたワイドギャップ半導体の光物性評価
岡本晃一、高賢哲、川上養一、藤田茂夫、寺嶋正秀、
応用物理学会関西支部セミナー、京都大学、2000 年 3 月
7. 3 次非線形分光法で見た ZnSe 系半導体の光熱変換過程
岡本晃一、川上養一、藤田茂夫、寺嶋正秀
応用物理学関係連合講演会 2000 年 3 月 27-30 日 東京

8. 時間-空間分解レーザー分光法を用いたワイドギャップ半導体の光物性評価
岡本晃一、高賢哲、川上養一、藤田茂夫、寺嶋正秀
応用物理学会関西支部セミナー 2000年3月 大阪
9. Photothermal Processes of ZnCdSe/ZnSe Quantum Well Structures Probed by the Third-order Nonlinear Spectroscopy.
K. Okamoto, Y. Kawakami, Sg. Fujita, M. Terazima,
The Third SANKEN International Symposium, Osaka, March 14-15, 2000
10. Protein dynamics studied by new photothermal techniques (招待講演)
M. Terazima, 11th International conference on Photothermal and photoacoustic phenomena, Kyoto, 2000, 6/25-6/29
11. Initial step of photothermal effect
R. Miyata, M. Terazima, 11th International conference on Photothermal and photoacoustic phenomena, Kyoto, 2000, 6/25-6/29
12. Energy dissipation process of photoexcited charge transfer complexes in fluids studied by the transient grating method
N. Saga, Y. Kimura, M. Terazima, N. Hirota, 11th International conference on Photothermal and photoacoustic phenomena, Kyoto, 2000, 6/25-6/29
13. Enthalpy and volume changes on the pH jump process studied by the transient grating technique.
J. Choi, N. Hirota, M. Terazima, 11th International conference on Photothermal and photoacoustic phenomena, Kyoto, 2000, 6/25-6/29
14. Energy storage and reaction volume in the photocycle of photoactive yellow protein
K. Takeshita, N. Hirota, Y. Imamoto, M. Kataoka, F. Tokunaga, M. Terazima, 11th International conference on Photothermal and photoacoustic phenomena, Kyoto, 2000, 6/25-6/29
15. Study of the protein structure dynamics and energy dynamics after ligand dissociation from carboxymyoglobin
M. Sakakura, N. Hirota, M. Terazima, 11th International conference on Photothermal and photoacoustic phenomena, Kyoto, 2000, 6/25-6/29
16. Photothermal processes of wide-bandgap semiconductors probed by the transient grating method
K. Okamoto, Y. Kawakami, S. Fujita, M. Terazima, 11th International conference on Photothermal and photoacoustic phenomena, Kyoto, 2000, 6/25-6/29
17. 過渡グレーティング法で見た GaN 系半導体の非輻射再結合過程
岡本晃一、川上養一、藤田茂夫、寺嶋正秀、中村修二、四宮源市

18. 蛋白質の光誘起構造ダイナミクス

寺嶋正秀

分子研シンポジウム 分子研 2000年5月25-27日

19. Ultrafast photothermal effect in solution

M.Terazima

Seminar in Max Planck Institute, Germany, July 18 (2000).

20. Photoinduced structural and energy changes of some biological molecules studied by the time-resolved photothermal techniques (招待講演)

M.Terazima

XVIII IUPAC symposium on photochemistry into new century, Dresden, Germany, July 22-27, (2000)

21. 時間分解非線形分光法による蛋白質の構造ダイナミクス (招待講演)

寺嶋正秀

生体分子科学討論会 仙台 2000年8月1-2日

22. シトクロムCの折り畳みにおける体積変化と過渡的な会合

名田智一、寺嶋正秀、奥野貴士、廣田俊、山内脩

生体分子科学討論会 仙台 2000年8月1-2日 23

23. 過渡グレーティング法でみた GaN 系半導体の非輻射再結合過程

岡本 晃一, 川上 養一, 藤田 茂夫, 寺嶋 正秀

応用物理学会学術講演会、北海道工業大学、2000年9月

24. Time-resolved protein dynamics studied by nonlinear optical spectroscopy

M.Terazima, Japan-America Frontier Science Symposium, Irvine, USA, Sep.21-24 (2000).

25. 三次の非線形分光法による光化学反応過程の研究 (受賞講演)

寺嶋正秀

光化学討論会 札幌 2000年9月25-27日

26. 過渡回折格子法によるたこロドプシン光反応中間体のエネルギーとダイナミクス

西奥義憲、寺嶋正秀、廣田襄、中川将司、津田基之

光化学討論会 札幌 2000年9月25-27日 3D05

27. マラカイトグリーンの電子励起エネルギーの熱化過程

宮田涼司、寺嶋正秀

光化学討論会 札幌 2000年9月25-27日 3P061

28. 気液界面での表面と分子のダイナミクスの時間分解検出
中山伊織、寺嶋正秀
分子構造総合討論会 2000年9月27日-30日 1p271
29. PYPの光反応における構造とエネルギーダイナミクス：変異体を用いた比較
竹下寛、寺嶋正秀、廣田襄、今元泰、三原憲一、片岡幹雄、徳永史生 4B2
30. 超臨界アルコール中におけるラジカル拡散定数の測定
大森努、木村佳文、寺嶋正秀、廣田襄
分子構造総合討論会 2000年9月27日-30日 2p142
31. pHジャンプ手法を用いた蛋白質の unfolding 過程の研究
J.Choi、寺嶋正秀
分子構造総合討論会 2000年9月27日-30日 1p151
32. 過渡回折格子法によるカルボキシミオグロビンの光解離過程の研究-Wild type と distal His 変異体の比較
坂倉政明、小西一誠、森島績、寺嶋正秀
分子構造総合討論会 2000年9月27日-30日 4p8
33. Nonradiative Recombination Processes in GaN-based Semiconductors Probed by the Transient Grating Method.
K. Okamoto, Y. Kawakami, Sg. Fujita, M. Terazima, and S. Nakamura,
International Workshop on Nitride Semiconductors, Nagoya, Sep.24-27, 2000
34. Microscopic Patterning on the Polysilane Films by the Laser Induced Grating Technique.
K. Okamoto, T. Tojo, H. Tada, M. Terazima, K. Matsushige
Korea-Japan Joint Forum 2000, Organic Materials for Electronics and Photonics, Kyoto, Oct.4-6, 2000
35. 溶液内光化学反応中間体の拡散過程
寺嶋正秀
第23回溶液化学シンポジウム 分子研 2000年11月16日-18日 104
36. Energy transfer process from electronic energy to thermal energy in solution (招待講演)
M.Terazima, PacifiChem, Hawaii, Dec.13-19(2000).
37. 光トリガーによる蛋白質のダイナミクス (招待講演)
寺嶋正秀
分子研研究会「動的側面から見たタンパク質の分子科学：揺らぎの理解に向けて」 分子研
2000年12月25日-27日

38. Time-Resolved Structural and Energy Changes of Proteins Detected by the Laser Induced Transient Grating (招待講演)

M.Terazima, Photochemical Processes in Gas, Condensed Phases and Bio-system: Interplay between Experiments and Theories, Okazaki Conference Center, Jan.10, - Jan.12(2001)

39. Direct Observation of the Nonradiative Recombination Processes in InGaN-based LEDs probed by the third-order Nonlinear Spectroscopy

K. Okamoto, S. Saijo, Y. Kawakami, Sg. Fujita, M. Terazima, T. Mukai, G. Shinomiya, S. Nakamura
SPIE Photonics West Optoelectronics 2001, , San Jose, California USA, Jan.20-26,2001

40. Time-Resolved Structural and Energy Changes of Proteins Detected by the Laser Induced Transient Grating

M.Terazima, International Conference on "Chemical Reaction Dynamics in Manybody Chemical Systems", Feb.21-22,2001.

41. 低転位 GaN 上 InGaN/GaN MQW における非輻射過程の評価

井上 謙一, 泉 知明, 岡本 晃一, 川上 養一, 藤田 茂夫, 寺嶋 正秀, 辻村 歩, 木戸口 勲
応用物理学会学術講演会、明治大学、2001 年 3 月

42. ピコ秒過渡回折格子法による InGaN 系 LED におけるキャリア・励起子の拡散過程の直接観測

岡本 晃一, 西條 慎, 川上 養一, 藤田 茂夫, 寺嶋 正秀, 四宮 源市, 向井 孝志
応用物理学会学術講演会、明治大学、2001 年 3 月

43. MOVPE 成長 ZnO の過渡グレーティング(TG)法による評価

尾形健一、岡本 晃一, 寺嶋 正秀, 西條 慎, 藤田 静雄, 藤田 茂夫,
応用物理学会学術講演会、明治大学、2001 年 3 月

44. タコロドプシン光反応におけるエンタルピー及び体積変化

西奥義憲、中川将司、津田基之、寺嶋正秀

日本化学会春季年会 2001 年 3 月 27-30 日 神戸 2C329

45. 蛋白質の構造変化に伴う拡散定数の変化

J.Choi、寺嶋正秀

日本化学会春季年会 2001 年 3 月 27-30 日 神戸 2C327

46. 体積とエンタルピーの変化から見る光受容蛋白質 PYP の中間体構造ダイナミクス

竹下寛、寺嶋正秀、三原憲一、今元泰、片岡幹雄、徳永史生

日本化学会春季年会 2001 年 3 月 27-30 日 神戸 2C328

47. 過渡回折格子法を用いた MbCO の光解離過程における CO 放出の観測
坂倉政明、小西一誠、森島績、寺嶋正秀
生体分子科学討論会 金沢 2001 年 7 月 5-6 日 8
48. タコロドプシン光反応中間体エネルギー準位の時間分解測定
西奥義憲・中川将司・津田基之・寺嶋正秀
光生物学討論会 北海道 2001 年 6 月 28-29 日
49. Kinetics of biological intermediate species which cannot be detected by optical transition
Masahide Terazima
IUPAC Congress and 41st IUPAC General assembly 29 June to 8 July 2001 Brisbane, Australia
50. A new technique to study protein dynamics: Energy and structural changes of photoreceptor proteins
M. Terazima
Photobiology and energy conversion process, Nagoya, July 27-28(2001).
51. Photophysical and photochemical dynamics of biological proteins from picosecond to millisecond studied by the laser-induced transient grating
Masahide Terazima, XX International Conference on Photochemistry, Moscow, Russia, July 31 - August 3, 2001
52. 低転位 GaN 上 InGaN/GaN MQW における非輻射過程の評価(II)
井上 謙一, 岡本 晃一, 川上 養一, 寺嶋 正秀, 藤田 茂夫, 辻村 歩, 木戸口 勲
第 62 回応用物理学学会学術講演会、2001 年
53. Protein dynamics monitored from the thermal energy releasing process by the time-resolved transient grating technique
Masahide Terazima
5th Photoacoustic and Photothermal Phenomena Gordon Research Conference, Oxford, August 19-24, 2001
54. Energy transfer processes from the electronic energy to the thermal energy in solution
Masahide Terazima
5th Photoacoustic and Photothermal Phenomena Gordon Research Conference, Oxford, August 19-24, 2001
55. Fast Photo-Heating Process Studied by Ultrashort Laser Induced Acoustic Wave
Masahide Terazima, 17th International Congress on Acoustics, Rome (Italy) in Sep.2-6, 2001. (Invited)
56. 蛋白質の光励起エネルギー放出機構
宮田涼司, 寺嶋正秀
分子構造討論会 2001 年 9 月 24-27 日 北大 4B11

57. 過渡回折格子法で観た蛋白質の折りたたみダイナミクス
名田智一、寺嶋正秀
分子構造討論会 2001年9月24-27日 北大 2p002
58. 気液界面における表面波のダイナミクス
中山伊織、寺嶋正秀
分子構造討論会 2001年9月24-27日 北大 2A04
59. 近対向過渡回折格子法による超臨界流体中の電荷移動錯体の光励起ダイナミクスの検討
木村佳文、綱島裕之、寺嶋正秀
分子構造討論会 2001年9月24-27日 北大 3p012
60. 超臨界アルコール中におけるラジカル拡散定数の測定
大森努、木村佳文、廣田襄、寺嶋正秀
分子構造討論会 2001年9月24-27日 北大 4B13
61. ラジカル拡散に対する水素結合の影響
寺嶋正秀・岡本晃一・野上唯・伊庭野大輔・富永敏弘
溶液化学シンポジウム 岡山大学 9月20日-22日 1O10
62. 新しい時間分解分光法で観た溶液内分子ダイナミクス(Invited)
寺嶋正秀
溶液化学シンポジウム 岡山大学 9月20日-22日 S1
63. 光受容蛋白 PYP の構造とエネルギーダイナミクス
竹下寛、三原憲一、今元泰、片岡幹雄、徳永史生、寺嶋正秀
光化学討論会 金沢 2001年9月10-13日 1D05
64. 変性状態でのカルボキシミオグロビンの光解離反応のダイナミクス
J.Choi、寺嶋正秀
光化学討論会 金沢 2001年9月10-13日 3P41
65. 電子励起エネルギーが熱に変換される速度：マラカイトグリーン
宮田涼司、寺嶋正秀
光化学討論会 金沢 2001年9月10-13日 1B18
66. 低転移 GaN 上 InGaN/GaN MQW における非輻射過程の評価 (II)
井上謙一、岡本晃一、川上養一、藤田茂夫、寺嶋正秀
応用物理学会 9月13日

67. タコロドプシン光反応における中間体エネルギー準位の時間分解測定

西奥義憲・中川将司・津田基之・寺嶋正秀

日本生物物理学会年会 大阪 2001 年 10 月 6-8 日 1P142

68. MbCO 光解離反応に対する Xe の影響と ligand pathway に関する研究

坂倉政明、西原泰孝、木村佳文、寺嶋正秀

日本生物物理学会年会 大阪 2001 年 10 月 6-8 日 2P62

69. Time-resolved protein dynamics monitored by optical nonlinear spectroscopy

M.Terazima

Japan America Frontier of Science, Tokyo, Oct.9-12, 2001

70. 非線形光学分光法で観る新しいエネルギーと分子ダイナミクス(招待講演)

寺嶋正秀

分子工学コロキウム、京大工学部 2001 年 11 月 2 日

71. 蛋白質の時間分解エネルギー・構造変化 (招待講演)

寺嶋正秀

生理研研究会「生体分子ダイナミクス及びプリオン機構研究会」分子研 2002 年 2 月 6-8 日

72. 分子間相互作用と熱化過程および分子拡散

寺嶋正秀

「化学反応現象に特徴的な非平衡非定常性の解明—現代化学からみた統計理論の再考—」公開シンポジウム、分子研、岡崎、2002 年 3 月 8 日-10 日

成果

(1) 化学反応における時間分解エンタルピー変化 (ΔH) と体積変化 (ΔV) 測定法

蛋白質構造変化を検出しそのダイナミクスを明らかにする上で、エンタルピー変化 (ΔH) や体積変化 (ΔV) は基本的で重要な量になる。これは蛋白質のみならず、化学反応一般における基本的量でもある。従来、蛋白質のダイナミクスについては、光吸収や発光あるいは光散乱を受けるクロモフォアをプローブに多くの研究が成されてきているが、エンタルピー変化や体積変化など全体構造を反映する量を知らずには、蛋白質構造変化ダイナミクスの更なる展開は困難なのではないだろうか。これまでこうした立場からの研究が全くなかったことは、その実験的制限に由来すると考えられる。目的の項にも述べたように、古典的手法である、平衡定数の温度依存性や圧力依存性は非可逆な反応に用いることはできない。当然これらの量の時間発展については考えもつかないことになる。古典的手法以外に用いられている従来の (おそらく唯一の) 方法は、光照射に伴う音波を測定する光音響法である。しかし、この手法では音波発生に熱の寄与と体積変化の寄与が同時に存在し、何らかの方法で分離しなければ意味のあるデータとならず、時間に依存する ΔH や ΔV を研究することはほとんど不可能であった。これに対し、我々は過渡回折格子 (TG) 法の時間分解を利用して、一般的に光化学反応に適用できる ΔH 、 ΔV 測定法を開発する事ができた。これは熱による信号は熱拡散定数により減衰するのに対し、体積変化や中間体の生成による信号はそれ自体の時定数や分子拡散定数で変化することを利用した方法である。この方法により初めて体積変化やエネルギー変化の観点から蛋白質のダイナミクスが追跡できるようになった。また、拡散定数の時間変化より、やはり全体構造の時間発展を検出可能とした。

(2) pH ジャンプ法

特に水溶液中での化学反応において、pH は重要な働きをすることが多い。化学反応の途中で任意に pH を変化させることができれば、非常に興味深い反応制御が可能となると考えられる。ここでは瞬間的に pH を変化させるため、パルスレーザーで誘起する化学反応を用いることを試みた。光反応によりプロトンを放出する分子としてニトロベンズアルデヒド

(NBA) を用いた (図 1)。この分子を光励起した後の TG 信号を検出すると、熱由来の信号の後に、非常に速い減衰と、比較的ゆっくりした減衰が見られた (図 2)。この減衰速度定数より、速く減衰する成分の拡散定数を見積もると約 $1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ と、通常の分子拡散より 1 桁以上速い拡散であることがわかった。このことより、観測している信号が生成したプロトン由来の信号であることを示しているものと同定した。プロトンは光吸収が無いので、その検出は pH 指示薬などを使わなければならない非常に困難であり、また pH 指示薬を用いてプロトン

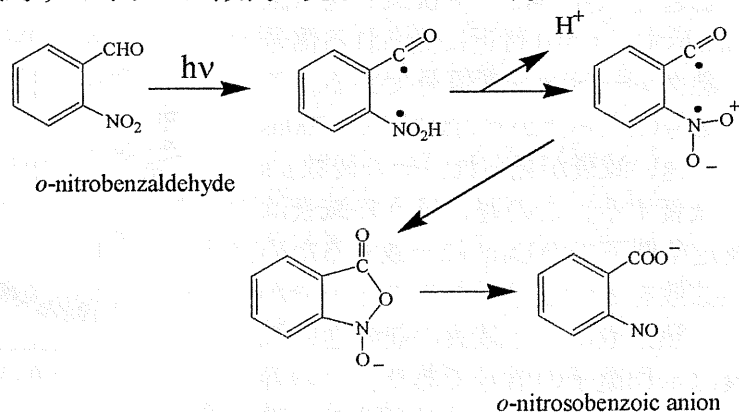


図 1 NBA の光分解反応

ダイナミクスを測定した場合も、その指示薬との反応のために、ダイナミクスが変化する可能性もある。TG 信号によりプロトンの体積を直接捕らえることで、そのダイナミクスが直接検出できることは、非常に興味深い。このように、光によりプロトン在水中に放出することが可能であることが示されたので、こうした pH ジャンプを示す系の更に詳しい解析、および実際の反応系への pH ジャンプ法の適用を試みた。現在は、蛋白を含んだ NBA 溶液での、光反応の研究を続けている。

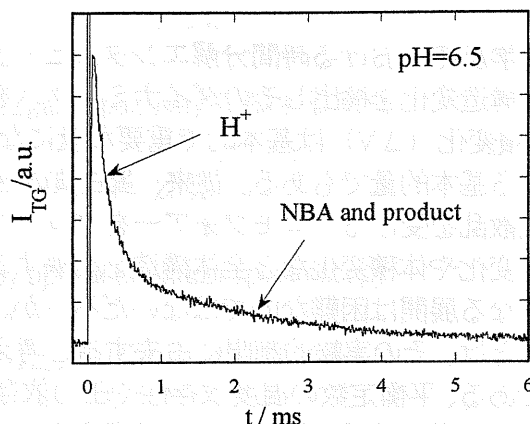
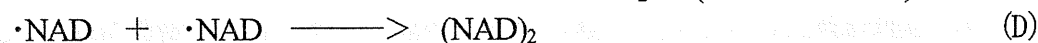
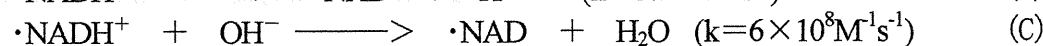
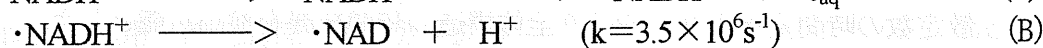


図2 NBA 励起後に観測される TG 信号

(3) 光還元法

NADH は脱気条件の下、355nm のレーザーパルスにより二光子励起されて水和電子を放出し、ラジカルを生成する。



放出された水和電子とラジカルは強い酸化還元電位を持つため、この反応を還元開始反応（トリガー）として用いることができる。

まず NADH のみを光励起したときの TG 信号について調べた。IR レーザーでプローブした時の TG 信号（励起光強度 $340 \mu\text{J/pulse}$ ）を（図 3）に示す。t=0 付近に見られる信号は熱グレーティング信号である。この信号の立ち上がり付近には $\sim 700\text{ns}$ での速い減衰が見られ、その後数 μs で減衰する。この遅いほうの減衰は測定条件下での $D_{H_2O} q^2$ に一致するため、熱拡散を表す信号であることが分かる。熱拡散による減衰の前の速い減衰は水和電子の信号であり、その寿命は NADH の濃度に逆比例する。熱が減衰した後の長い時間スケールでは山型の信号が見られる（図 3）。ミリ秒

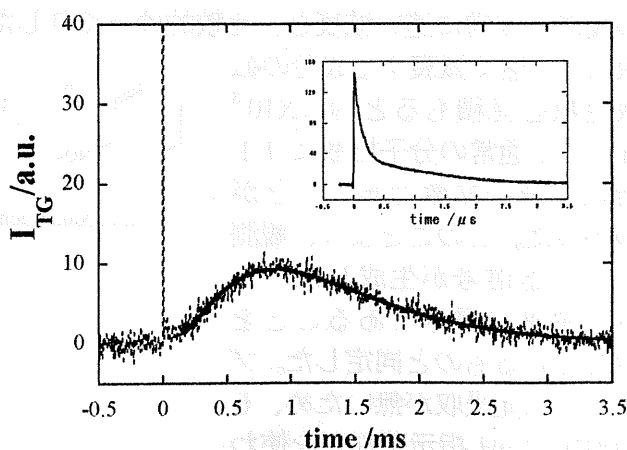


図3 NADH 励起後の TG 信号

時間スケールでの山型の信号は非常に弱く、励起光強度は $300 \mu\text{J}$ 以上でないと見えない。この信号は2つの分子種の拡散として解析された。この山型信号を2つの指数関数でフィットすることで信号の減衰定数が求められる。この速度定数を q^2 に対しプロットすることで、この傾きによりそれぞれの分子の拡散定数が得られた。立ち上がりと減衰の拡散係数はそれぞれ、 $D_{\text{rise}} = 4 \pm 1 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ 、 $D_{\text{decay}} = 2 \pm 0.5 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ であった。

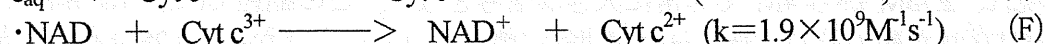
反応スキーム (A) ~ (D) を考えるとミリ秒のタイムスケールで拡散しうる分子種は NADH と $\cdot\text{NAD}$ 、 $(\text{NAD})_2$ の3種であることが分かる。 $(\text{NAD})_2$ と比べると NADH と $\cdot\text{NAD}$ の拡散係数は大きく、お互いに近いことが予想されるため、立ち上りを NADH と $\cdot\text{NAD}$ の拡散係数に、減衰を $(\text{NAD})_2$ の拡散に同定した。

(4) チトクロム c の折り畳みへの応用

金属を含む蛋白質では、その金属の酸化状態により、蛋白の安定性が異なることがある。そのため、金属の酸化状態をレーザー光により変化させることにより、折り畳みを引き起こすことが可能となる。ここでは、NADH を用いて、チトクロム c を光還元させ、その後の蛋白の折りたたみを調べた。

まず、変性条件を調べるため、各グアニジン濃度における酸化型及び還元型の CD スペクトルを測定した。222nm での旋光度は α -ヘリックスの存在を反映するため、この波長の旋光度によって、タンパク質が構造を持つかどうかを判断することができる。グアニジン濃度を高くしていくと変性が起こるが、酸化型 (変性中点 $C_m = 2.9\text{M}$) と還元型 ($C_m = 5.6\text{M}$) では変性が起きる濃度に違いがある。このため、酸化型チトクロム c が変性し、還元型チトクロム c が構造を持つグアニジンの濃度範囲があり、ここで酸化型チトクロム c を還元すると、折り畳みを開始させることができる。

NADH とチトクロム c を入れて光を当てると、ミリ秒以内の速いタイムスケールで還元が起こることを過渡吸収法で確認した。



チトクロム c は還元型のピークを 550 と 520nm、酸化型のピークを 535nm に持つ。グアニジン濃度によってもピーク位置に変化はなく、酸化型と還元型を見分ける良い指標となる。NADH による還元が起これば 550nm、520nm に吸収の信号が現れ、535nm にブリーチの信号が見られる。この3点で過渡吸収を測定し、チトクロム c の還元を確認した。脱気を行わずに酸素が溶液中に存在する場合には還元は起こらず、信号は見られなかった。チトクロム c のみによる光還元がないことは NADH を含まない条件下では還元を表す信号が見られないことによって確認した。還元速度はサンプルの状態に依存するが、十分に脱気を行った条件では $300 \mu\text{s}$ 以内に還元が起こる。この信号を指数関数でフィットすると還元速度定数として、 $\sim 3 \times 10^4 \text{s}^{-1}$ が得られる。還元が起こった後信号は一定となるのだが、その後秒のオーダーで還元を示す信号は減衰していく。これは再酸化によるものであると考えられる。また、還元速度、再酸化速度、還元の絶対量はどれもグアニジン濃度により変わらないことも確認した。還元の絶対量が一定であることは、酸化型と還元型のエネルギーポテンシャルの差がグアニジン濃度によって変わらないことから支持される。このように NADH の光励起により $300 \mu\text{s}$ 以内という早い時間でチトクロム c を還元することができ、これを用い

てチトクロムcの折り畳みを開始させることができることが分かる。

次にNADH溶液にチトクロムcを加えた。グアニジン濃度を変えて得られたTG信号を(図4)に示す。時刻0でのピークは、NADHの光励起反応による熱由来の信号である。NADHの信号は、チトクロムcの存在により信号強度が小さくなり、また励起光強度もNADHのみの測定時よりも弱くしても(200 μ J/pulse)十分な信号の強度が見られた。よってNADHの信号成分はチトクロムcを加えたときの測定条件ではほとんど確認できない。これはおそらく、チトクロムcの還元によって(NAD)₂の生成がないためであると考えられる。(F)過程)

TG信号は、グアニジンの濃度に依存して変化する。0Mでは非常に小さい300 μ s以内での立ち上がり、単調減衰の信号が見られた。立ち上がりは還元の速度に近く、減衰はチトクロムcの拡散として解析でき、この信号はどのグアニジン濃度に対しても見られるので、還元によるチトクロムcの屈折率変化もしくは吸収変化の信号であると考えられる。グアニジン濃度が2Mを越えると、この単調減衰の信号の後に山型の信号が現れ、2.75Mから4Mで非常に大きな信号となる。この範囲では信号が非常に大きく、0Mで見られた熱の後の減衰成分は相対的に無視されるほどとなる。3.25M付近を信号強度の頂点として、6Mにかけて山型の信号はほぼ消失する。グアニジンの濃度が高いときも、やはり熱の後の比較的ゆっくりした減衰成分は存在し、山型の信号に対して相対的に大きくなる。

チトクロムcのみのサンプルでは熱による信号しか見えず、今回の実験で得られた信号はNADHとチトクロムcの反応による信号であることが確認できた。更にNADHの高濃度溶液による還元が起きない酸素雰囲気下では、やはり熱によるTG信号しか見えず、還元が起こる条件でのみ、熱の後の減衰や山型の信号が見えることを確認した。これらのことより、観測された山型信号は、還元により生成する信号であると考えられる。また、この還元によりチトクロムcの折り畳みを誘起できることは、次のように確認した。酸化型が変性し、還元型が折り畳むグアニジン濃度(4M)で光を当て続け、CDスペクトルを測定すると、222nmで旋光度が大きくなっていくのが見られた。従って、信号には折り畳みの過程が含まれていると考えられる。

最も興味あることは、この信号はグレーティング波数が高いときは観測されず、波数が小さくなるに従って現れてくることである(図5)。TG信号の減衰は蛋白の拡散によって決まっているため、波数が高いときには短い時間範囲が観測され、波数が小さくなると長い

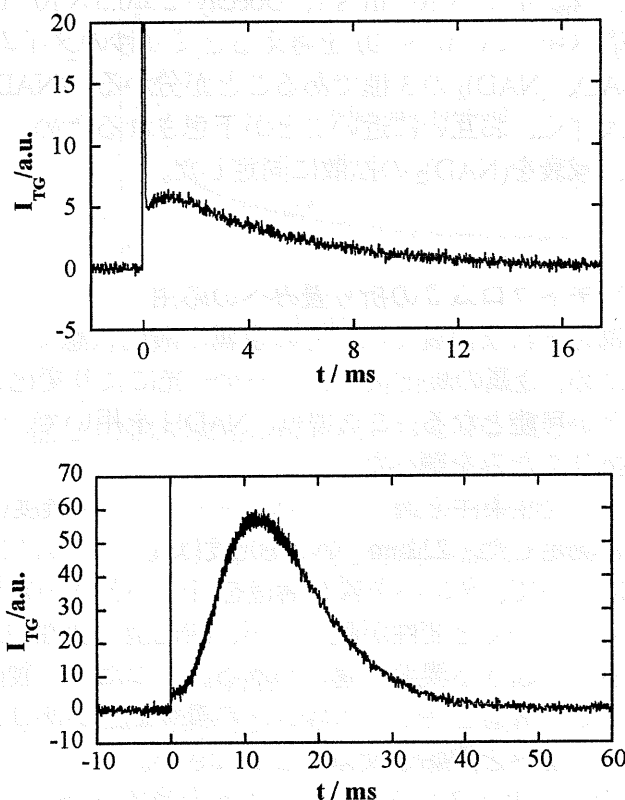


図4 GdnHCl濃度依存性(上: 0M、下: 2.5M)

時間範囲が観測できる。よって、この信号の波数依存性は、時間がたつに従って、2つの拡散定数の異なる分子種が現れてきていることを示していると思われる。種々の波数での信号の時間変化を統一的に解析したところ、蛋白の折りたたみに従って拡散定数がだんだん大きくなっていくしているとして合理的に解釈された。このことは、蛋白質が折りたたまれた構造の拡散定数が、変性蛋白のそれよりも大きいと言う、我々のほかの実験とも一致する。現在、この時間変化を解析することで、蛋白の3次構造がどのような時定数で変化しているかを解析しつつある。

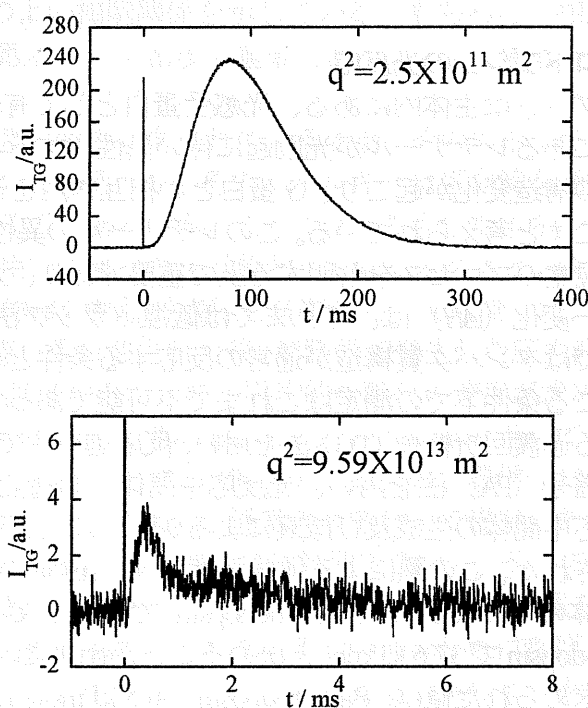


図5 TG信号の波数依存性

(5) ミオグロビンの光リガンド解離に伴う構造変化とエネルギー

光によって蛋白質にトリガーを与えることの可能な蛋白で、最も研究されているのはミオグロビンであろう。リガンドのついたミオグロビンを光励起することで、数ピコ秒以内にリガンドがヘムから解離し、それに伴って蛋白質構造が変化する。これはヘモグロビンに見られるアロステリック効果と関係すると考えられるため、また高速分光法にも適しているため、多くの研究がこれまでになされてきた。ところが、依然として、室温でのエネルギー変化やリガンドの蛋白からの脱離速度など基本的な多くのことが不明のまま残されていた。こうした点や蛋白質の構造変化について調べるため、上述の方法を適用した。TG信号を定量的に解析することで、光で切れたCOが蛋白質から抜け出るのに室温で700nsかかること、COが切れた瞬間に蛋白質は約 $5 \text{ cm}^3/\text{mol}$ の体積収縮があること、COが蛋白質から出ると $15 \text{ cm}^3/\text{mol}$ の膨張になることなどが明らかとなった。また各中間体のエネルギーを決めることもできた。更に、COが geminate recombination できるサイト以外に、もう一つヘムポケットがあることも明らかとなった。

また、体積変化の原因を探るため、distal His と呼ばれる、リガンドに近い His を他のアミノ酸で置換したミュータントを作成し、そのダイナミクスを研究した。リガンドがヘムから離れて蛋白質に閉じ込められた状態での体積変化を測定したところ、この体積の値には大きなミュータント依存性が見られた。このことは、リガンドが蓄えられる位置が、distal 基のアミノ酸によって決まることを示していると思われる。興味深いことに、リガンドが蛋白から外に逃げ出したときの体積変化の値は、COの溶媒中での部分モル分子体積とほぼ同じであった。このことは、リガンドが蛋白でトラップされる位置は、従来考えられてきたような空洞（キャビティ）ではなく、アミノ酸が充填されているところにもぐりこんで行くと

いう描像を考えさせる結果である。

(6) ロドプシンの光反応

ロドプシンは生体内にある、光感受蛋白として有名である。この光感受性のトリガーは、蛋白内にあるレチナールが光励起に伴い異性化することでおこる。このトリガーに引き続き、蛋白質の構造変化が起こり、G 蛋白との相互作用を通して、脱分極が起こり、脳への刺激を引き起こすと考えられている。このレチナールの異性化に続く幾つかの短寿命中間体については、視覚のプロセスを解明する上で重要であり、大きな興味を持たれている。例えば、エネルギー変化 (ΔH) は、これまでは低温トラップ法で求められてきたが、トラップされた条件下ではタンパク質構造が通常の反応する条件と異なっている可能性がある。しかし、反応の起こる条件下での測定はこれまで不可能であった。本研究では、唯一時間分解測定が可能である過渡回折格子 (TG) 法を用い、反応進行中での中間体の ΔH の検出を試みた。また、光音響信号 (PA) 法を用い、光反応中間体の構造変化 ΔV の検出も試みた。

各反応中間体の生成及び減衰によるシグナルと、反応により放出された熱によるシグナルが観測された。この熱による信号強度より、 ΔH の時間変化を求めることが可能である。 ΔH は中間体の一つである Bathorhodopsin で 145.8 kJ/mol、Lumirhodopsin で 122.0 kJ/mol、Mesorhodopsin で 37.6 kJ/mol と決めることが出来た。これは室温で初めての ΔH 測定である。低温で求められた値は、Bathorhodopsin 130.5 kJ/mol、Lumirhodopsin 53.3 kJ/mol、Mesorhodopsin ~ 18 kJ/mol であり、室温とトラップされた中間体で ΔH が大きく異なっている中間体があることが分かる。また光音響信号を測定し、この解析により反応に伴う体積変化 ΔV をた。その結果、 $\Delta V_{\text{rho} \rightarrow \text{batho}} = +30 \text{ ml/mol}$ 、 $\Delta V_{\text{Batho} \rightarrow \text{Lumi}}$ 及び $\Delta V_{\text{Lumi} \rightarrow \text{Meso}}$ で $-1 \sim -5 \text{ ml/mol}$ という結果が得られた。

(7) 高速エネルギー放出過程

蛋白質からのエネルギー散逸過程を時間分解で観測するために、エネルギー放出を速い時間スケールで検出するための方法を開発した。グレーティング光により発熱現象が起こると、媒体の膨張が起こり音波が発生する。もしこの発熱過程に遅れがあると、デルタ関数的に発生した時に観測される音波から少し時間が遅れて立ち上がることになる。この遅れを、音響信号のピークの時間遅れとして測定することで、数ピコ秒の精度で熱発生速度を求められることを明らかにした。この手法を用いて、有機溶媒中における有機分子の光励起後に起こる発熱速度を測定し、イオンと水のように分子間相互作用が大きい系でも、数ピコ秒よりも速く発熱が起こっていることがわかった。

この手法を幾つかの有機分子に適用した結果、有機溶媒中においては、数 ps と数 10ps の 2つの異なった速度で温度が立ち上がっていることが明らかとなった。発熱体からの連続媒体への熱伝導として考えて温度の時間変化を計算することで、この測定結果をよく説明することができることがわかった。その結果によると、2つの時定数は、溶質溶媒間の相互作用で決まる速さと、溶媒間を熱が逃げていく速さに対応することがわかった。また、温度上昇を再現するためには、励起された分子の周囲の溶媒に均等にエネルギーが移るのではなく、数個の溶媒分子に選択的にエネルギー移動が起こっていることを示唆する結果を得た。

熱化過程と分子間相互作用との関係を明らかにするため、溶媒や溶質の特性と熱化の速度との相関を調べた。その結果、溶媒のもつ OH 基の濃度と熱化速度がよい相関をもつことを見出した。このことは、溶質-溶媒間の水素結合がエネルギーを効率よく受け渡すために重要であることを示しているものとして解釈した。更に、溶質効果を検討した結果、電荷を

もつような分子では無電荷の分子に比べて熱化速度が速いことが判明した。この結果も、溶質-溶媒間の相互作用と熱化の効率とのよい相関関係を示している。もちろん、相互作用の大きさだけでなく、エネルギーを受け取るモード密度も重要であることが、最近の重水素化効果の実験結果から示唆されている。

一方で、そうした励起される分子が蛋白質内に含まれているとき、そのエネルギー変換過程は、溶液中と比べてどのようなようになるのであろうか。そのエネルギーは蛋白質を通過するのだろうか、それとも直接溶媒へ移動するのであろうか。ここでは、こうしたエネルギー移動の機構を、ピコ秒の過渡回折格子法を用いて調べた。対象としてはミオグロビンを用い、そのへみを励起した後のピコ秒領域での体積の熱膨張過程を音響波として観測した。この音響信号は、励起エネルギーが熱となり溶媒に受け渡された後、熱膨張で発生した圧力波である。この音響信号のピークの位置を正確に測定することで、平均的な熱化の速度が求められる。これまで調べてきた多くの有機分子では、励起状態の緩和から 4~15ps ほど遅れて温度上昇することがわかっている。ところが驚くべきことに、Mb を光励起後の音響信号ピークシフトは、約-15ps と負の値をとることがわかった。これは、通常の有機分子で提案したような、励起分子から溶媒への単純なエネルギー移動を考えていては説明できない。そこで、励起されたへみのエネルギーが蛋白部分に移動し、蛋白が一時的に熱膨張を起こす過程を考えた。この場合、蛋白の熱膨張により音波が発生するが、この圧力波の時間依存性は溶媒の熱膨張過程と異なるため、この波が溶媒膨張の波と干渉を起こすと考えると、負のピークシフトが予想されることがわかった。これまで報告されている Mb の冷却過程と、今回観測されたピークシフトを同時に再現することで、タンパク質中でのエネルギー変換機構を議論できた。

その他の成果

(1) 気体/液体界面でのダイナミクス

生体膜をはじめ、化学触媒など多くの反応は界面で起こるため、そうした非対称環境下での分子ダイナミクスを明らかにすることは非常に重要である。しかし、界面における分子数が、それぞれの相における分子数に比べて圧倒的に少ないため、バルク中で成功を収めてきた分光法をそのまま適用したのでは、バルク中での応答に打ち消されて界面現象は見えてこない。ここでは、プローブ反射法の TG を用いて、気体/液体界面における TG 信号のダイナミクスを検討したところ、その信号にはレーザー誘起の表面波が大きく寄与していることがわかった。このレーザー誘起の表面波発生について調べたところ、有機溶媒表面では光吸収による熱膨張と共に表面張力の減少による波が重なっているとして理論的によく説明できた。一方、水溶液表面では観測された CW のダイナミクスは、これまでの理論と幾つかの点で一致しなかった。この水溶液独特の食い違いが何に由来するためかを調べるため、溶かしている溶質依存性ととも、表面に分子膜を張ったときの CW ダイナミクスを観測し、これらを比較することで、有機溶質が溶けているときの表面状態についての知見を得ることを試みた。この結果、CW のダイナミクスに表面における粘弾性が現れてきていることが分かった。これまで、ポリマー溶液などでは、粘弾性の影響が現れるという報告があったが、普通の溶液で観測されたことは無かった。ここで粘弾性の影響が見られたのは、高い波数の CW を過渡的に作り出したためではないかと考えられる。

(2) ラジカル拡散運動

溶液内の拡散過程は分子間相互作用と密接な関係があることが予想されながら、これまでそうした立場での研究が少ない。これは、拡散過程が基本的に非常に遅い過程であり、化学的に興味深い活性分子の拡散を測定することが不可能であったためである。従来は数時間から日のオーダーでしか測定のできなかった拡散過程を、過渡回折格子法を用いることでミリ秒からマイクロ秒の時間で検出し、過渡分子の拡散ダイナミクスが明らかにできることをこれまでの研究で示してきた。ここでは、この手法をミセル中での電荷をもつイオンラジカルに適用し、分子の電荷とミセルの電荷の拡散過程に及ぼす影響を検討した。